

MC1R 유전자의 PCR-RFLP를 이용한 한우육과 젓소육 /black Angus 수입육의 구분

김태중 · 이재일*

전남대학교 수의과대학
(게재승인: 2005년 8월 22일)

Discrimination of Hanwoo from Holstein/black Angus meat by PCR-RFLP of MC1R gene

Tae-Jung Kim, Jae-Il Lee*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
(Accepted: August 22, 2005)

Abstract : The melanocortin 1 receptor (MC1R) plays an important role in regulation of melanin pigment synthesis within mammalian melanocytes. Mutations within the gene encoding MC1R have been shown to explain coat color variations within several mammalian species including cattle. To develop a rapid and accurate method for the identification of Hanwoo, we performed a modified PCR-RFLP analysis of MC1R gene using single nucleotide polymorphism (SNP) within MC1R as a target. A size of 538 bp (537 bp for Hanwoo) was amplified by PCR, digested with *Hpa* II, and electrophoresed on a 1.5% agarose gel. A PCR product from Hanwoo showed a single band of 537 bp, whereas two fragments of 328 bp and 210 bp were detected in both Holstein and Black angus. The current result suggests that the PCR-RFLP using our primers and enzyme digestion system would be very accurate, easy and reproducible method to discriminate between Hanwoo and Holstein/Black angus meat.

Key words : MC1R, coat color, PCR-RFLP, Hanwoo

서 론

소의 모색은 품종의 특징을 나타내고 개체 및 품종을 식별하는 수단으로 이용될 수 있는 대표적인 형질이다. 그러나 소의 품종구별이 외형적 특징인 모색, 체형 등에 의존하는 것이 지금까지의 방법이었어서 표현형으로 구별되는 소의 품종이라 할지라도 도축하여 쇠고기 형태로 전환되면 품종별 식별은 거의 불가능하다. 더구나 유통과정에서 한우육과 젓소육이 한우육으로 둔갑해 판매되는 경우가 발생하여 소비자와 양축농가의 경제적 손실 및 피해가 발생하여 한우산업의 경쟁력이 약화되어 왔다. 따라서 순수한 한우육을 명확히 구별할 수 있는 한우육 판별기술개발은 양축농가 및 소비자를 보호하고 유통과정 중 발생하는 한우 둔갑육을 차단해 쇠고기 시

장을 활성화시키기 위해 반드시 필요하다. 분자생물학적인 접근을 통해 국내에서 이러한 문제를 해결하려는 노력이 있었다. 즉 PCR을 이용한 RAPD(random amplified polymorphic DNA)기법이 국내에서 쇠고기 품종구별 및 각종 육류의 축종판별 [3]에 사용되었고 국외에서도 동물의 유전분석 및 품종식별에 폭 넓게 응용되어 왔다 [7, 8, 11, 13, 19]. 그러나 RAPD 기법은 PCR 증폭조건에 대한 민감성이 매우 높고 결과의 재현성과 정확성이 낮기 때문에 실용화에는 문제가 있다 [10, 16, 23]. 또 PCR-SSCP(single-strand conformational polymorphism) 방법 [6, 17] 등도 시도되었지만 재현성 및 신뢰도의 문제로 실용화가 되지 못한 것이 사실이다. 이러한 단점을 극복하고자 몇 가지 실험이 고안되었고 이미 본 연구진은 MC1R 유전자에서의 single

*Corresponding author: Jae-Il Lee

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
[Tel: +82-62-530-2854, Fax: +82-62-530-2857, E-mail: jaeil@chonnam.ac.kr]

nucleotide polymorphism(SNP)와 관련한 3'-tailed primer system을 이용하여 황갈색의 모색종인 한우 및 이와 다른 모색의 품종과의 구별법을 보고한 바 있다 [1].

소를 비롯한 포유동물에서 모색발현에 관여하는 MSH receptor(melanocyte-stimulating hormone receptor 1; MC1R) 유전자는 멜라닌의 확산 및 합성을 자극하는 호르몬 수용체이다. 포유동물의 모색을 결정하는 tyrosine-derived melanin에는 두 가지 색소 즉, 적색/노란색을 나타내는 pheomelanin과 갈색/검정색을 나타내는 eumelanin이 있는데 이들의 합성, 색소 세포 내의 상대적 양을 조절하는 두 개의 좌위인 Extention(E)과 Agouti(A)가 중요한 역할을 하는 것이 밝혀졌다 [22]. 포유동물에서 MC1R 돌연변이가 모색변이를 일으킨다는 사실이 발견되어 색소합성에 관여하는 MC1R 유전자의 돌연변이를 검출하기 위해 PCR-RFLP(PCR-restriction fragment length polymorphism)분석 방법을 이용해 말에서 MSH receptor의 염기서열 분석결과 이 유전자의 단일 missense 돌연변이가 chestnut 빛깔의 모색과 관련이 있고 [17], 돼지에서 돼지품종 및 모색별로 특징있는 MSH receptor 유전자형을 제시하였으며 [14], 소 [12, 15], 면양 [21] 등의 여러 축종을 대상으로 모색변이에 관한 연구가 이루어졌다.

지금까지 수행된 MC1R 유전자의 RFLP 방법을 사용한 실험 즉, 김 등 [2]은 한우와 젓소 유전자를 판별하는데 있어 제한 효소처리 후 4% metaphore agarose gel을 사용하여 전기영동을 하였고, 이 등 [4]과 정 등 [5]은 각각 8%, 13% polyacrylamide gel에 전기영동을 한 후 silver stain을 사용했다. 이는 제한 효소 처리 후 저분자량의 DNA 밴드 검출을 목적으로 한 것이다. 이러한 방법들은 저분자량의 DNA 밴드 검출에 유리하지만 일반적으로 실험실에서 간편하게 사용되는 agarose gel을 사용한 전기영동 방법에 비하면 실험과정이 복잡하며 비용과 시간이 많이 드는 단점이 있었다. 이에 기존 방법과는 달리 정확하고 간편하며 일반적인 실험실에서 수행이 가능한 실용적인 한우육 판별기술을 개발하고자 축우의 모색발현에 관여하는 MC1R 유전자의 PCR-RFLP를 이용해 한우와 다른 모색을 가진 품종들인 Holstein 및 Black angus의 판별을 위해 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료

DNA를 얻기 위한 시료는 김 등 [1]에 의한 방법에 준하여 실시하였다. 즉 도축장에서 Holstein 20개체, 한우 20개체, Black angus 5개체, Hereford 5개체, 그리고 황

색과 흑색이 혼합되어 있는 일명 “먹우” 1개체로부터 각각 근육시료를 채취하였다. 각각의 품종은 그 모색에 따라 구분하여 실시하였다. 즉 Holstein은 흰색과 검은색만의 혼합이어야 하고, 한우는 검은색이나 기타 모색의 혼합이 없어야 하며, Black angus는 다른 모색의 혼합 없이 완전히 검은색을 띤 개체이며, Hereford는 황색과 백색만의, 그리고 먹우는 황색과 검은색이 혼합되어 있는 것으로 품종을 구분하였다.

DNA 분리

근육 및 혈액으로 부터 DNA 분리 및 정제는 Miller 등 [18]의 phenol/chloroform 추출방법의 일부를 변형해 실시하였고 분리된 DNA는 TE buffer(10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.4) 적당량을 넣어 50 µg/ml 농도로 준비하였다. 분리된 DNA는 1% agarose gel을 사용하여 확인하였다.

Primers

GenBank(AF445642)에 등록된 MC1R 유전자인 Bos taurus melanocortin 1 receptor(MC1R) mRNA를 지정하는 cDNA 영역의 E-locus가 포함된 382에서 919번째 염기서열 부위의 583 bp 단편을 증폭하기 위해 primer로서 forward primer로 5'-CAGTGCCTGGAGGTGTCCAT-3'와 reverse primer는 5'-GGCCAGCATGTGGACGTAGA-3'를 사용하였는데, 이는 Gene Runner™ software를 사용하여 염기배열을 설계하여 합성(Bionics, Korea)하였다.

PCR에 의한 MC1R의 증폭 및 전기영동

PCR 반응을 위해 반응액은 template DNA 1 µl, 각 20 pM primer 1 µl, MgCl₂ free 10× PCR buffer 5 µl, 25 mM MgCl₂ 5 µl, 2.5 mM dNTP 5 µl, Taq DNA polymerase(5 U)(Promega, USA) 1 µl를 첨가하고 멸균증류수를 첨가하여 총 50 µl로 조정하였다. PCR 수행은 94°C에서 5분간 pre-denaturation한 후 94°C/30초, 56°C/30초, 72°C/1분씩 3단계로 35 cycles 수행한 후 마지막으로 72°C에서 5분간 extension을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물을 1.5% agarose gel에서 확인하였다.

제한효소 처리에 의한 DNA 절단 및 전기영동

전기영동으로 확인된 MC1R 유전자의 PCR산물은 GeneClean II kit(Qbiogene; USA)를 사용하여 gel elution을 수행한 뒤, PCR산물은 제한효소 Hpa II (Promega, USA)를 이용하여 절단하였다. 제한효소 처리는 10× elution buffer 2 µl, DNA 10 µl, BSA(bovine serum albumin, 10 mg/ml) 0.5 µl, 제한효소인 Hpa II 1 µl, 멸균증류수 6.5 µl를 넣어 총 20 µl가 되게 하여 37°C에서 3

시간 동안 반응시킨 후 1.5% agarose gel을 사용하여 확인 하였다.

결 과

PCR에 의한 MC1R 유전자의 확인

한우와 다른 품종을 판별하기 위해 MC1R 유전자의 확인하기 위한 1쌍의 primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 모든 시료에서 538 bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었다.

RFLP에 의한 한우육의 구분

GenBank에 기초한 MC1R 유전자 염기서열 정보 및 제한 효소 *Hpa* II의 작용을 통해 2개의 restriction pattern이 나타날 것을 예상할 수 있었다(Fig. 2). 그 결과, 제한 효소 *Hpa* II를 이용한 RFLP pattern은 한우와 다른 모색 품종과의 구분을 가능케 해 주었다. 즉 제한 효소 *Hpa* II로 처리한 결과, Holstein과 Black angus 중에서는 두종 모두 328과 210 bp 크기의 분해산물을 관찰할 수 있었고, 한우육에서는 분해되지 않은 537 bp 크기의 band를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이를 통해 제한 효소 *Hpa* II를 이용한 PCR-RFLP는 한우와 다른 모색의 품종들인 Holstein 및 Black angus를 감별하는 효과적인 방법임을 알 수 있었다. 하지만 황색과 백색의 혼합종인 Hereford

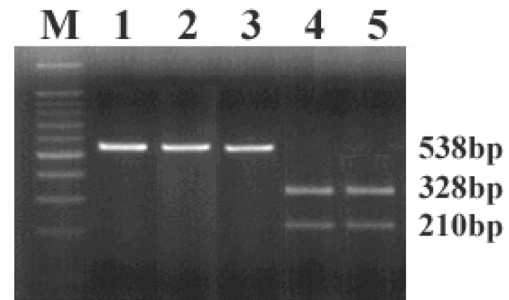


Fig. 3. PCR-RFLP profiles of MC1R gene digested with *Hpa* II on a 1.5% agarose gel electrophoresis. Lane M: 100 bp DNA ladder; Lane 1 represents Hanwoo, lane 2 Hereford, lane 3 Mukwoo, lane 4 Holstein, and lane 5 Black angus. The same restriction patterns were shown within the same strains, respectively.

의 경우(5개체)와 황색과 검은색의 혼합종인 먹우(1개체)의 경우는 순수황색의 한우와 restriction pattern이 같아서 구분이 되지 않았다.

고 찰

포유동물의 Pro-opiomelanocotin으로부터 유도된 melanocotin은 부신피질 세포에서 스테로이드 합성을 자

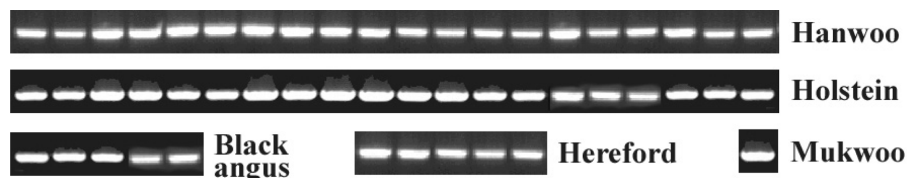


Fig. 1. MC1R-specific PCR analysis of Hanwoo, Holstein, Black angus, Hereford, and Mukwoo. PCR products of 538 bp were produced in all cattle meat samples (20 Hanwoo, 20 Holstein, 5 Black angus, 5 Hereford, and 1 Mukwoo).

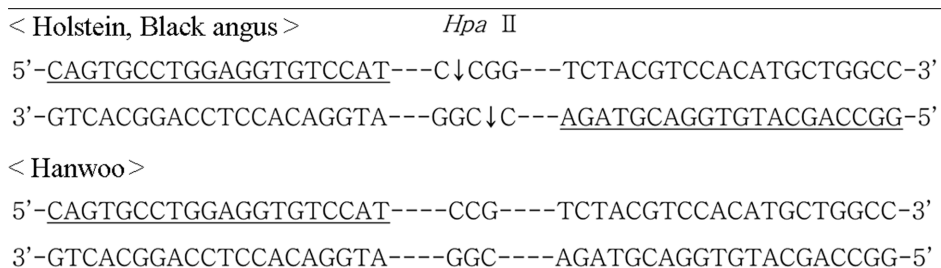


Fig. 2. Schematic presentation of the location of the amplified fragment in the bovine MC1R gene for PCR test. The vertical arrows indicate the *Hpa* II restriction sites. The primers are underlined.

극하는 adrenocorticotrophic hormone과 멜라닌 세포에서 멜라닌형성에 관여하는 melanocyte-stimulating hormone으로 구성되어 있으며 생리적 및 기능적 활성도에 따라 5개의 subtype으로 분류된다 [20]. 특히, 포유동물의 모색발현에 관여하는 MC1R 유전자는 멜라닌의 확산 및 합성을 자극하는 호르몬 수용체이다. 이들은 적색/노란색을 나타내는 phaeomelanin과 갈색/검정색을 나타내는 eumelanin의 합성, 색소 세포내의 상대적 양을 조절하는 두개의 좌위인 Extention(E)과 Agouti(A)에 중요한 역할을 하는 것이 밝혀졌다 [22]. 멜라닌 형성은 tyrosinase에 따라서 phaeomelanin과 eumelanin 생성이 달리 발현되고 이 효소의 활성은 extension 좌위를 지정하는 α -MSH와 MC1R에 의해 조절된다 [9, 14, 15, 22]. 색소합성에 관여하는 MC1R 유전자의 돌연변이를 검출하기 위해 PCR-RFLP 분석 방법을 이용한 결과 MC1R을 지정하는 유전자 내에서의 돌연변이는 소, 말, 면양, 돼지, 마우스, 여우 등 여러 동물종 내에서 모색변이와 관련되어 있는 것으로 보고되었다 [14, 15, 17, 22].

MC1R 유전자의 RFLP 방법을 사용한 국내논문에서 김 등 [2]은 한우와 젖소 유전자를 판별하는데 있어 제한 효소처리 후 DNA 크기가 작아서 4% Metaphore agarose gel을 사용하였고, 이 등 [4]과 정 등 [5]은 polyacrylamide gel에 전기영동을 한 후 silver stain을 사용했다. 이는 소량의 DNA 시료 분석과 저분자량의 DNA 밴드 검출을 목적으로 사용되었으며 이러한 방법들은 저분자량의 DNA 검출에 유리하지만 비용과 시간이 많이 들고 인체에 신경독성과 체내 축적등을 일으켜 유해하여 잘 사용하지 않는 단점이 있었다. 그래서 본 실험에서는 1.5% agarose gel만을 사용해 결과를 도출해 내었기에 편리성과 재현성, 정확성, 경제성을 겸비한 한우육 판별법이라 할 수 있다.

본 실험에서는 MC1R 유전자 594번째 G 단일 염기가 결실된 부위를 포함하도록 design된 primer를 이용하여 PCR로 증폭시킨 결과 모든 개체에서 동일하게 538 bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었다. 그리고 이 PCR 증폭산물을 gel elution을 시킨 후 Hpa II 제한효소로 각각 절단한 다음 agarose gel 전기영동법으로 검출한 각 sample별 RFLP 양상은 Fig. 2와 같다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 Hpa II 제한효소로 절단하였을 때 MC1R 유전자중 104번째 아미노산을 결정하는 codon에서 G 단일 염기가 소실되지 않은 Holstein과 Black angus는 328 bp와 210 bp 밴드 두개를 관찰할 수 있었고, 한우에서는 G 단일 염기가 소실되어서 잘리지 않았으므로 537 bp 크기의 단일 밴드를 확인할 수 있었다. 이로써 단순히 한우와 다른 모색의 품종간의 염색체 변이를 신속 간편하게 인지하면서 한 종류의 제한효소에 의하여 검출

되는 품종 특이적인 PCR-RFLP 유전자형이 확인되었다. 본 실험 결과, 순수 황색의 한우나 황색이 혼합되어 있는 Hereford 및 먹우의 경우 그 결과가 순수한우와 같게 나타났다. 이러한 황색 모색의 유도는 순수하게 MC1R 유전자좌에서 G 단일 염기가 소실됨으로 인하여 일어나는데 본 실험에서 사용된 비교군인 Hereford와 먹우는 모두 황색 모색 유전자를 가지고 있으므로 결과가 순수 황색의 한우와 동일하게 나온 것임을 알 수 있다.

따라서 본 실험에서 사용한 한우육과 젖소육의 판별이 가능한 1.5% agarose gel을 사용한 MC1R 유전자의 RFLP는 순수한 한우육을 젖소육과 Black angus육으로부터 명확히 구별할 수 있는 정확하고 간편하며 재현성 있는 감별법이라 판단되며, 양축농가 및 소비자를 보호하고 유통과정 중 발생하는 한우 둔갑육을 차단해 쇠고기 시장을 활성화시키고 소비자 및 양축농가의 경제적 손실 및 피해를 줄이고 한우산업의 경쟁력을 강화시킬 수 있으며 나아가 유통과정 중 젖소육이 한우육으로 둔갑되는 문제점을 방지할 수 있을 것이라 판단된다. 하지만 실험결과에서 아직까지도 황색 혼합모종(Hereford 등)과 순수 황색우(한우)를 분별하는 방법은 존재하지 않는다. 그리고 우리나라의 수입육우중에 상당 부분이 황색 혼합모종(Hereford 등)인 점을 생각하면 순수 황색우와 황색 혼합종간의 분자생물학적 분류법의 확립이 반드시 필요하다고 하겠다.

참고문헌

1. 김태중, 박성도, 이재일. 소 모색관련 MC1R 유전자의 SNP와 관련한 3'-tailed primer를 이용한 한우육의 판별. 한국동물자원과학회지 2004, **46**, 897-902.
2. 김태현, 윤두학, 박용우, 이혜영, 오성종, 정일정, 탁태영, 김경남, 한재용. 소 품종별 Melanocortin Receptor 1 (MC1R) 유전자의 유전자형 빈도에 관한 연구. 한국동물자원과학회지 2000, **42**, 735-744.
3. 민병록, 한재용, 이무하. RAPD기법을 이용한 쇠고기 품종(한우육, 우유육(Holstein육), 수입우육)구분. 한국동물자원과학회지 1995, **37**, 651-660.
4. 이성수, 양영훈, 강승률, 오운용, 양보석, 고서봉, 오성종, 김규일. 한우, 제주재래흑우, 흑모화우와 갈모화우에서의 MSH Receptor(MC1R) 유전자의 유전자형 및 빈도 비교. 한국동물자원과학회지 2000, **42**, 253-260.
5. 정의룡, 김우태, 김연수, 한상기. 소 모색관련 유전자 MC1R의 PCR-RFLP Marker를 이용한 한우육 판별. 한국동물자원과학회지 2000, **42**, 379-390.
6. 정의룡, 김우태, 김연수, 한상기. PCR-SSCP 기법을 이용한 소 MC1R 유전자의 다형성 분석 및 한우육 감별. 한국동물자원과학회지 2001, **43**, 45-52.
7. Appa Rao KB, Bhat KV, Totey SM. Detection of species-specific genetic markers in farm animals through

- random amplified polymorphic DNA (RAPD). Genet Anal 1996, **13**, 135-138.
8. **Bailey E, Lear TL.** Comparison of thoroughbred and Arabian horses using RAPD markers. Anim Genet 1994, **25**, 105-108.
 9. **Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C, Kesterson RA.** The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. Recent Prog Horm Res 1996, **51**, 287-317
 10. **Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL.** Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. Biotech 1993, **14**, 214-217.
 11. **Gwakisa PS, Kemp SJ, Teale AJ.** Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers. Anim Genet 1994, **25**, 89-94.
 12. **Joerg H, Fries HR, Meijerink E, Stranzinger GF.** Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene. Mamm Genome 1996, **7**, 317-318.
 13. **Kemp SJ, Medrano JF.** Randomly primed PCR amplification of pooled DNA reveals polymorphism in a ruminant repetitive DNA sequence which differentiates *Bos indicus* and *B. taurus*. Anim Genet 1994, **25**, 83-88.
 14. **Kijas JM, Wales R, Tornsten A, Chardon P, Moller M, Andersson L.** Melanocortin receptor 1(MC1R) mutations and coat color in pigs. Genetics 1998, **150**, 1177-1185.
 15. **Klungland H, Vage DI, Gomezraya L, Adalsteinsson S, Lien S.** The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. Mamm Genome 1995, **6**, 636-639.
 16. **MacPherson JM, Eckstein PE, Scoles GJ, Gajadbar AA.** Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. Mol Cell Probes 1993, **7**, 293-299.
 17. **Marklund L, Moller MJ, Sandberg K, Andersson L.** A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. Mamm Genome 1996, **7**, 895-899.
 18. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988, **16**, 1215
 19. **Smith EJ, Jones CP, Bartlett J, Nestor KE.** Use of randomly amplified polymorphic DNA markers for the genetic analysis of relatedness and diversity in chickens and turkeys. Poult Sci 1996, **75**, 579-584.
 20. **Takeuchi S, Takahashi S.** Melanocortin receptor genes in the chicken-tissue distributions. Gen Comp Endocrinol 1998, **112**, 220-231.
 21. **Vage DI, Klungland H, Lu D, Cone RD.** Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. Mamm Genome 1999, **10**, 39-43.
 22. **Vage DI, Lu DS, Klungland H, Lien S, Adalsteinsson S, Cone RD.** A non-epistatic interaction of agouti and extension in the fox, *Vulpes vulpes*. Nat Genet 1997, **15**, 311-315.
 23. **Yu K, Pauls KP.** Optimization of the PCR program for RAPD analysis. Nucleic Acids Res 1992, **20**, 2606.